云 南 植 物 研 究　2006, 28 (4): 359～362
Acta Botanica Yunnanica

利用ISSR标记对新疆白梭梭居群的遗传多样性分析

张　萍[1]，董玉芝[1]，魏　岩[1]，胡成志[2]
(1 新疆农业大学林学院，新疆 乌鲁木齐　830052; 2 新疆大学，新疆 乌鲁木齐　830046)

摘要: 利用ISSR分子标记对新疆白梭梭4个居群，105个个体进行了遗传多样性的比较分析。在供试材料中，11个引物共扩增出171个多态位点，多态位点百分率为84.85%，4个居群的多态位点百分率差异在33.92%～40.35%之间。Shannon多样性指数 (I) 为0.3518，物种水平的Nei基因多样度 (h) 为0.3482。遗传变异分析表明，物种水平的居群间遗传分化系数Gst为0.6238，居群间的基因流Nm为0.3016。遗传分析表明吐鲁番居群和甘家湖居群的遗传距离最近。

关键词: 白梭梭; ISSR; 遗传多样性
中图分类号: Q 943　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0253-2700(2006)04-359-04

Analysis of Genetic Diversity of *Haloxylon persicum* (Chenopodiaceae) in Xinjiang by ISSR

ZHANG Ping[1], DONG Yu-Zhi[1]**, WEI Yan[1], HU Cheng-Zhi[2]
(1 *College of Foresty*, *Xinjiang Agricultural University*, Urumqi 830052, China;
2 *College of Xinjiang University*, Urumqi 830046, China)

Abstract: ISSR molecular markers were used to detect genetic diversity of 105 individuals in four populations of *Haloxylon persicum*. 171 polymorphic bands were induced by amplication primers. Percentage of polymorphic bands is 84.85% and the difference among four populations ranged from 33.92% to 40.35%. Shannon's indices of diversity (I) is 0.3518 and Nei's gene diversity (h) is 0.3482 respectively. Genetic variance analysis showed that the coefficient of gene differentiation in the species is 0.6238 and the gene flow is 0.3016 among populations. Genetic distance and cluster analysis indicated that the populations of Ganjiahu and Tulufan had the smallest genetic difference.

Key words: *Haloxylon persicum*; ISSR markers; Genetic diversity

白梭梭 (*Haloxylon persicum* Bunge ex Boiss. et Buhse) 是我国西北荒漠地区优良的固沙植物，隶属藜科梭梭属 (*Haloxylon*)，小半乔木，具有极强的抗旱性。在我国新疆与梭梭 (*Haloxylon ammodendron* (C. A. Mey.) Bunge) 镶嵌分布，主要分布于古尔班通古特沙漠、乌伦古特河沿岸沙丘、乌苏沙漠等地。白梭梭只生长于北疆沙漠的流动沙地、半流动沙地和半固定沙地上，分布区狭窄。白梭梭的生长型和梭梭一样，根系强大，具有锚状根，耐干旱，耐风蚀，耐沙埋，为典型的沙生超旱生植物 (中华人民共和国林业部，1989)。近年来，由于水分条件、过渡放牧、鼠害、尤其是人为破坏的影响，白梭梭生境遭到严重破坏。我国已将其列为国家三级保护植物，并列入《中国珍稀濒危植物名录》(王成云等，2004)。

简单重复序列区间扩增多态 (inter-simple sequence repeats, ISSR) DNA (Zietkiewicz 等，1994)

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30260009)，新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (200421112)

通讯作者: Author for correspondence. E-mail: dyz830052@126.com

收稿日期: 2005-10-21, 2006-04-10 接受发表

作者简介: 张萍 (1980-) 女，硕士生，主要从事林木遗传育种方面研究。

具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需DNA量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点，广泛用于分子遗传学等方面的研究(何予卿等，2001；肖龙骞等，2003)。国内外近年来在林木方面也开始采用此方法（Tsumura，1996；李海生，2004；袁建国，2005；安泽伟，2005)。但对白梭梭进行遗传多样性的研究还未见报道。

开展珍稀濒危物种的遗传多样性研究不仅有助于了解物种的进化和适应潜力以及探讨物种濒危的机制，同时对物种具体保护工作中如何采取科学有效的保护措施有重要的指导意义。本研究用分子标记对白梭梭的遗传多样性进行分析，为探讨白梭梭植物的致危原因和制定有效的保护措施提供重要的依据。

1　材料和方法

1.1　材料

作为试验材料的白梭梭种子，于2004年采集于新疆维吾尔自治区的阜康、甘家湖、莫索湾、吐鲁番4个地区（表1)，种子在光照培养箱内发芽后直接放入-70℃低温冰箱冷冻保存。所有实验均在中科院新疆生态与地理研究所分子生物实验室中进行。

表1　采样地点和生境特点

Table 1　Localities and habitats of populations

编号 No.	采样地区 Localities	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔 Altitude (m)	个体数 Number of samples	生境 Habitat
1	阜康（北沙窝)	87°52′	44°22′	433	30	沙丘
2	甘家湖自然保护区（乌苏)	83°39′	44°55′	328	27	沙丘
3	莫索湾	86°01′	45°07′	235	29	沙丘
4	吐鲁番沙漠植物园	89°11′	42°51′	-86	19	沙丘

1.2　DNA的提取

在传统CTAB法提取DNA的基础上略做改进（邹喻苹等，2001)，所提取的DNA呈白色或无色沉淀，电泳所显示的DNA带型清晰一致，无明显降解。在紫外分光光度计上检测其浓度，0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.3　ISSR的PCR扩增

ISSR引物由上海生物工程有限公司（Sangon）合成，采用了11个引物。在20 μl的反应体系中1×Reaction Buffer，Mg^{2+} 1.5 mmol L，模板40 ng，引物0.5 μmol L，Taq酶1 U，dNTP 0.15 mmol L。

本实验采用的PCR扩增程序为94℃变性1.5 min，进入下列35个温度循环：94℃变性45 s，51℃退火45 s，72℃延伸1.5 min，最后在72℃延伸5 min，扩增产物在4℃保存。扩增产物用1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，EB染色，电压为4 V cm。在自动凝胶成像系统上观察并拍照记录（图1)。

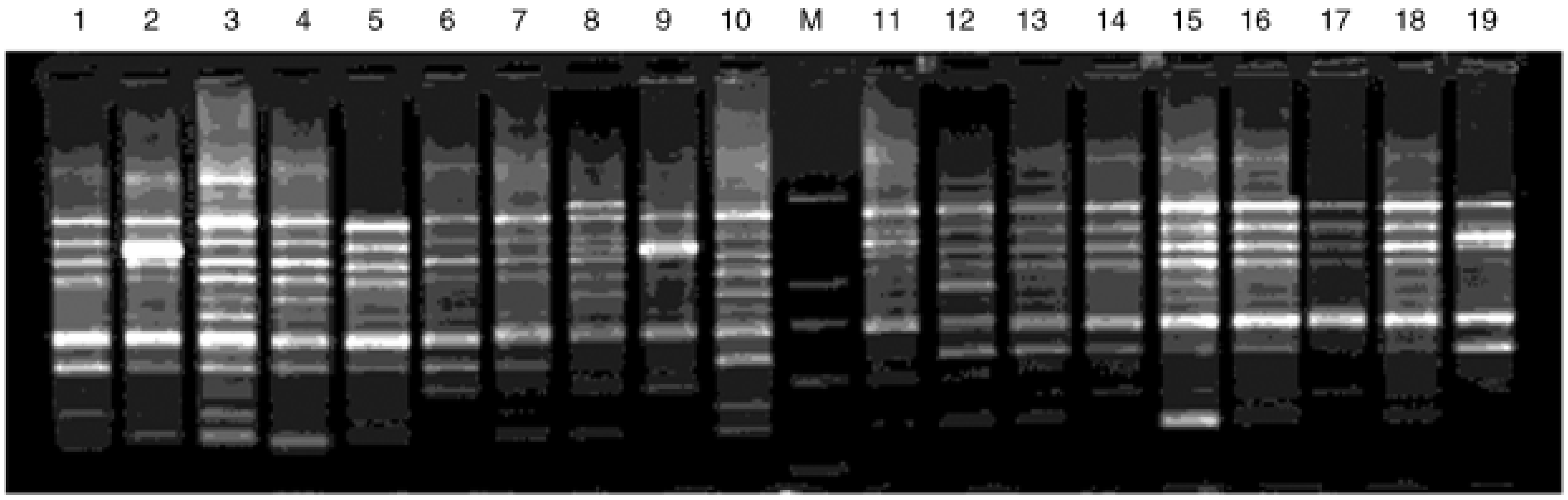

图1　引物AM38204对吐鲁番地区白梭梭样品基因组DNA的ISSR-PCR扩增结果，M为marker DL2000

（分子量从下往上依次为250、500、750、1000、2000)

Fig.1　Electrophoresis results of ISSR-PCR to sample genome DNA of Tulufan population with primer AM38204，M is marker 2000

(Molecular weight from down to up is 250、500、750、1000、2000)

1.4　数据统计与分析

总共采用了11个ISSR引物进行分析（表2)。对电泳中能稳定清晰出现的扩增片段（条带）记为1，无扩增条带的记为0，得到一个数据表征矩阵在某一特定位点上，扩增的DNA片段出现的频率小于0.99的位点即为多态位点的比率 P = 多态位点数 检测到的位点数（张

娟等，2003）。利用 PopGen32 分析软件计算其居群的群体遗传多样性。根据 Nei 的遗传距离（表 3）利用 Mega3.1 对所有居群进行聚类分析。

表 2　ISSR 引物序列

Table 2　ISSR primer sequences

序号 No.	引物序列 Primer sequence	多态性条带数 No.of polymorphic loci	多态位点比率（%） Proportion of polymorphic loci
AW24463	(CA)$_6$WS	13	76.47
AW24465	(CTC)$_4$WC	10	66.67
AW24468	(AC)$_8$SG	20	90.91
AW24469	(CAC)$_4$WC	18	85.71
AM38191	(CT)$_8$RC	15	88.23
AM38195	(CTC)$_5$	8	88.86
AM38196	(GACA)$_4$	18	94.73
AM38198	(GGAGA)$_3$	20	86.95
AM38202	(AC)$_8$YA	16	84.21
AM38204	(AG)$_8$YT	17	80.90
AM38206	CSC(GA)$_6$	16	84.21
平均		171	84.85

2　结果与分析

2.1　多态位点分析

通过 11 个 ISSR 引物对白梭梭 4 个居群 105 个个体的 DNA 样品进行了 ISSR 分析，共检测到 171 个位点，多态位点百分率为 84.85%，说明 ISSR 能够较好的用于本试验的分析。不同居群的白梭梭 ISSR 多态性位点百分率在 33.92% 到 40.35%之间（表 3）。

表 3　4 个居群的遗传多样性水平

Table 3　Genetic diversity between four populations

居群 Populations	多态位点比率（%） Proportion of polymophic loci	Nei 遗传多样性指数（h）	Shannon 多样性指数（I）
阜康（北沙窝）	33.92	0.1212	0.1785
甘家湖自然保护区（乌苏）	40.35	0.1360	0.2044
莫索湾	34.50	0.1308	0.1918
吐鲁番沙漠植物园	38.01	0.1368	0.2034
总体		0.3482	0.3518

2.2　遗传多样性与遗传结构

白梭梭总的基因多样度为 0.3488，居群内的基因多样度为 0.1312，遗传分化系数 Gst 为 0.6238（表 4），说明白梭梭遗传变异主要存在于不同居群间，白梭梭居群间出现较高的遗传变异。Shannon 多样性指数（I）为 0.3518，物种水平的 Nei 基因多样度（h）为 0.3482。居群间的基因流为 0.3016。

表 4　居群的基因多样性Nei's 分析

Table 4　Nei's genetic diversity in population

总采样数	居群总基因多样度（Ht）	居群内基因多样度（Hs）	居群间遗传分化系数（Gst）	基因流（Nm）
105	0.3488	0.1312	0.6238	0.3016

2.3　遗传距离

遗传距离是显性频率的函数，用于分析群体间的遗传相似性，表 5 反映了不同居群间的遗传距离和遗传一致度，遗传距离最小的为吐鲁番居群和甘家湖居群（0.3231），最大的是阜康居群和吐鲁番居群（0.4747）。聚类分析结果见（图 2）。

表 5　Nei's 遗传一致度（I）（右上角）和遗传距离（D）

Table 5　Nei's genetic identity（I）（above diagonal）and genetic distance（D）

	1	2	3	4
1	****	0.6482	0.6296	0.6221
2	0.4336	****	0.6959	0.7239
3	0.4627	0.3626	****	0.6780
4	0.4747	0.3231	0.3886	****

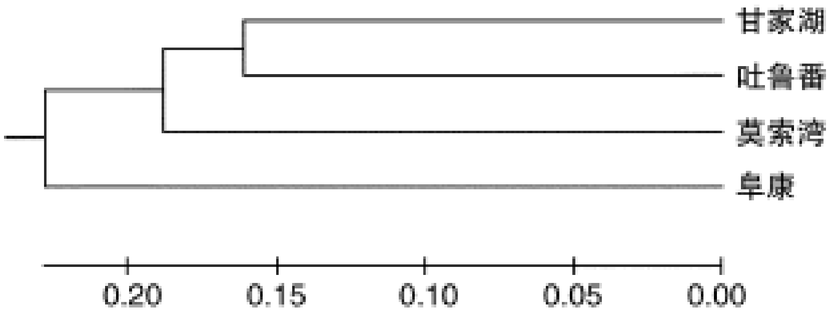

图 2　4 个群体的 UPGMA 聚类图

Fig.2　UPGMA dendrogram for the four populations

3　分析与讨论

遗传多样性可用来描述种群遗传变异和维持变异的机制，在对白梭梭 4 个居群的多态位点的分析中，多态位点百分率的排列从小到大依次为：阜康（33.92%）＜莫索湾（34.50%）＜吐鲁番（38.01%）＜甘家湖（40.35%）。遗传距离最小的为吐鲁番居群和甘家湖居群（0.3231），最大的是阜康居群和吐鲁番居群（0.4747）。其中吐鲁番的白梭梭居群是从甘家湖梭梭自然保护区引种栽培的，而聚类结果也表明吐鲁番和甘家湖的遗传距离最近，与实际情况相符。

基因流是影响群体内部和群体间遗传变异程度的重要因素，基因流越大，群体间的相似性越大。在 Widen and Svensson（1992）统计的 124 种植物中有 51%的物种的基因流 Nm＜1，35%的物

种的基因流 Nm < 0.5。白梭梭居群的基因流 Nm = 0.3018。表明居群内基因交流正常。所以我们认为基因流不是白梭梭的致危的原因。

遗传分化系数 Gst 为 0.6238，说明白梭梭遗传变异主要存在于不同居群间，白梭梭居群间出现较高的遗传变异。本研究所选用的居群间地理距离较大，而且不同分布区生态地理的差异、地理距离以及具体生境的差别，长期的自然选择致使不同分布区或生境的居群间出现了不同程度的分化。

作为超旱生荒漠植物，白梭梭对于防止土地沙漠化改善生态环境具有十分重要的意义。在保护珍稀濒危植物过程中栖息地的保护被认为是最重要的（廖文芳，2004）。然而由于准噶尔盆地具有丰富的油气资源，因此沙漠油气资源开发、沙漠公路等工程建设行为造成生境破碎和不连续性，影响了当地白梭梭植物的正常繁衍和群落发育。同时长久以来白梭梭作为当地的薪材主要来源，人口数量快速上升增大了对天然薪炭资源需求压力，再加上对野生动物的保护对食物需求量的增加，这些都是造成天然白梭梭林减少的原因。这些都在不同层次上改变白梭梭原来的生长环境，成为影响白梭梭致危的重要原因。

〔参考文献〕

Ai JG（**袁建国**），Qiu YX（**邱英雄**），Xu JH（**余久华**），2005. Optimization of inter simple sequence repeats (ISSR) analysis as applied to preliminary study of genetic variation in *Abies beshanzuensis* M. H. Wu [J]. *Journal of Zhejiang University*（**浙江大学学报**（Agric. & Life Sci.）），31（3）：277—282

An ZW（**安泽伟**），Sun AH（**孙爱花**），Cheng H（**程汉**），2005. Genetic Diversity among Wild and Cultivated Accessions of *Hevea brasiliehsis* (Rubber Tree) Detected by RAPDs and ISSRs [J]. *J Trop Subtrop Bot*（**热带亚热带植物学报**），13（3）：246—252

Hanrick JL, Godt MJW, 1990. Alloym e diversity in plant species [A]. In: Brown AHD, Clegg MT, Kahler AL *et al*. (eds). Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [M]. Sunderland: Sinauer

He YQ（**何予卿**），Zhang Y（**张宇**），Sun M（**孙梅**），*et al*，2001. Studies on the Relationship between Cultivated and Wild Rice Using ISSR Markers [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*（**农业生物技报**），9（2）：123—127

Li HS（**李海生**），Chen GZ（**陈桂珠**），2004. Genetic diversity of mangrove plant *Sonneratia caseolaris* in Hainan Island based on ISSR analysis [J]. *Acta Ecol Sin*（**生态学报**），24（8）：1657—1663

Liao WF（**廖文芳**），Xia NH（**夏念和**），Deng YF（**邓云飞**），2004. Study on genetic diversity of *Mauglietia decidua* (Magnoliaceae) [J]. *Acta Bot Yunnan*（**云南植物研究**），26（1）：58—64

Ministry of Forestry of the People's Republic of China（**中华人民共和国林业部**），1989. Xingjiang Forest [M]. Ulumq: Xinjiang People Press

Tsumura Y, Ohba K, Strauss SH, 1996. Diversity and inheritance of intersimple sequence repeat polymorphisms in douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*) [J]. *Theor Appl Genet*, 92: 40—451

Wang CY（**王成云**），Wei Y（**魏岩**），Yin LK（**尹林克**），*et al*.，2004. Research progresses of the drought-resistance of Haloxylon [J]. *Arid Zone Res*（**干旱区研究**），21（Addition）：64—69

Xiao LQ（**肖龙骞**），Ge XJ（**葛学军**），Gong X（**龚洵**），*et al*，2003. Genetic diversity of *Cycas guizhouensis* [J]. *Acta Bot Yunnan*（**云南植物研究**），25（6）：648—652

Zhou YP（**邹喻苹**），Ge S（**葛颂**），Wang XD（**王晓东**），2001. Molecular Markers in System and Evolution Botany [M]. Beijing: Sciences Press

Zhang J（**张娟**），Yin LK（**尹林克**），Zhang DY（**张道远**），2003. RAPD analysis on genetic diversity of natural populations of *Tamarix hispida* [J]. *Acta Bot Yunnan*（**云南植物研究**），25（5）：557—562

Zieticwiez E, Rafalski A, Labuda D, 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 20: 176—183